

研究課題番号	5RF-1951
研究課題名	「化学物質の内分泌かく乱作用を予測・検出する新たなスクリーニング法の開発」
研究実施期間	令和元年度～令和3年度
研究機関名	秋田県立大学
研究代表者名	堀江 好文

1. 研究開発目的

我が国の化学物質のリスク管理は、経済協力開発機構で国際的に同意された試験法（OECD TG）などに基づいて行われている。しかし、新規化学物質の届出件数は年々増加しており、従来の方法だけでは管理しきれない。そのため、今後の多種多様な化学物質を管理するためには、化学物質の特性や生態影響を短期間で評価できる新たな手法を開発する必要がある。

さらに、近年、上述した化学物質のリスク管理だけでなく、試験を実施する際の「動物福祉」に関する問題も懸念されている。ヨーロッパでは、魚類の「胚期」は生物ではなく、胚期を用いた試験は *in vitro* 試験として定義されており、最近の生態毒性試験では動物福祉の観点から、魚類の「胚期」のみを用いた試験が強く推奨されている。

研究代表者はこれまでに、分子生物学の観点から、「化学物質の内分泌かく乱作用が魚類の性分化に与える生物影響」に関する研究を実施してきた。その結果、内分泌かく乱作用のある化学物質が魚類の性分化に与える影響は、*Gsdf* という精巣分化決定遺伝子が鍵遺伝子であり、*Gsdf* 遺伝子は「胚期」からその発現が誘導されることを明らかにした（Horie et al, MCE, 2016）。

そこで、本研究計画では、「胚期」の *Gsdf* 遺伝子を指標とすることで、化学物質が魚類の性分化に与える内分泌かく乱作用を検出できる新たな生態毒性試験法を開発することを目的とする。さらに、開発した試験法を応用することで、実環境中に含まれる魚類の性分化に影響を与える内分泌かく乱作用を示す物質のスクリーニング手法を開発する。

2. 研究目標

〔全体目標〕

本研究では、内分泌かく乱作用のある化学物質が魚類のモデル生物メダカの性分化に与える生態影響の遺伝子メカニズムを明らかにし、さらには、特定の遺伝子を指標とすることで、実環境中に含まれる魚類の性分化に影響を与える内分泌かく乱作用を示す化学物質のスクリーニング手法を開発する。

本研究では、以下の実験を行うことにより、上記の目標を達成する。

1) 精巣分化を誘導する *Gsdf* 遺伝子が、魚類の性分化に影響を与える内分泌かく乱作用を示す化学物質の検出に有用なバイオマーカーであるかを明らかにする。

- ・ 女性ホルモン作用を示すビスフェノール A ・ ノニルフェノール、男性ホルモン作用を示すトレンボロンをメダカにばく露（魚類性発達試験；OECD TG No. 234）し、ばく露されたメダカの生殖腺の組織学的観察を行い、精巣卵や卵精巣、性転換の発生の有無を明らかにする。

- ・ 上記の化学物質をメダカ胚にばく露し、各化学物質が *Gsdf* 遺伝子の発現パターンに与える影響を明らかにする。

2) より簡便かつ安価に *Gsdf* 遺伝子の発現変動を解析できるようにするため、*Gsdf* 遺伝子と緑色蛍光タンパク質（GFP）遺伝子を組み込んで、男性ホルモン作用を検出すると生殖線が緑色に光り、女性ホルモン作用を検出すると生殖線の緑色の光が弱まる「化学物質のスクリーニングに用いるメダカ」を作出する。

3) 作出したメダカが、実際の環境水中に含まれる内分泌攪乱作用を示す物質のスクリーニングに活

用できるか検討する。

3. 研究の進捗状況

ビスフェノール A とノニルフェノールを用いて、*Gsdf* 遺伝子のバイオマーカーとしての有用性を検討した。その結果、精巣卵や性転換が誘導される濃度と胚期の *Gsdf* 遺伝子の発現パターンに与える影響濃度（対照区と比べて発現量が抑制）が一致していた。さらに、環境省の「環境ホルモン戦略計画 SPEED' 98」で実施された medaka Partial Life Cycle Test（OECD TG 234 試験に相当）の既存データを基に、ばく露物質数（p,p'-DDE、4-t-Octylphenol、Ethinylestradiol）を増やすことで *Gsdf* 遺伝子の有用性を確認した。その結果、精巣卵や性転換が誘導される濃度と胚期の *Gsdf* 遺伝子の発現パターンに与える影響濃度（対照区と比べて発現量が抑制）は似た傾向にあった。これらの結果から、*Gsdf* 遺伝子は魚類の性分化に影響を与える内分泌かく乱作用を示す化学物質の検出に有用なバイオマーカーであることが示唆された。

現在まで、計画通りに研究が実施され、期待された成果も得られている。今後、トレンボロンの解析や、環境省の「環境ホルモン戦略計画 SPEED' 98」で実施された既存データを基に、ばく露物質数を増やすことで *Gsdf* 遺伝子の有用性をさらに検討していく。

2 年度目に実施予定であった「化学物質のスクリーニングに用いるメダカ」の作出に関して、既に CRISPR-Cas9 用の sgRNA のデザインやプラスミド DNA の調整まで終わっているため、インジェクションの準備が整った。

既に、*Gsdf* 遺伝子のバイオマーカーとしての有用性の確認や「化学物質のスクリーニングに用いるメダカ」の作出に着手済のため、最終研究目標である「実環境中に含まれる魚類の性分化に影響を与える内分泌かく乱作用を示す化学物質のスクリーニング手法の開発」は予定通り達成できる見通しである。

4. 環境政策への貢献(研究代表者による記述)

化学物質は、微量で人間や野生生物に影響を示す可能性があるため、従来の生態毒性試験では、化学物質の生物影響を明らかにするためには、対象以外の化学物質の混入を極力避け、かつ微量での継続したばく露が可能になるような装置（魚類流水式曝露装置；図 3.1.1）などが必要となる。魚類流水式曝露装置は、汎用装置ではないため、その運転には経験とノウハウが必要とされ、さらに、従来の生態毒性試験では化学物質の内分泌かく乱作用を評価するのに、多くの時間（例；OECD TG No. 234 試験では約 70 日間、OECD TG No. 229 試験では試験魚の育成+試験期間で約 4 ヶ月）を要する。そのため、従来の方法を用いた試験法だけでは多種多様な化学物質の生態影響を明らかにするのに限界がある。

本研究の成果によって、胚期の *Gsdf* 遺伝子の発現パターンに着目することで、魚類の性分化に影響を与える内分泌かく乱作用を示す化学物質を検出できる可能性を示した。今後、「化学物質のスクリーニングに用いるメダカ」を作出し、その有用性を実証することで、より短期間（約 8 日間）で化学物質の特性（内分泌かく乱作用の有無）を明らかにすることができる新たなスクリーニング法を構築する。これにより、今後の化学物質の生態リスクの初期評価などに活用できることが期待される。

5. 評価者の指摘及び提言概要

メス化、オス化を同時に検出できる試験系開発で興味深い。またトランスジェニックメダカの開発も順調で今後の進展が期待でき、特に試験系が少ないオス化の試験系に期待する。短時間でのスクリーニングを可能にするという意味では有用な方法が開発されたといえる。適用対象（範囲）も含めた進捗が期待される。

内分泌かく乱作用のスクリーニングであれば、それなりの検出感度が要求されるのではないか。内分泌かく乱という観点から言って、現行すでに行われているような、より低濃度で減少現象を見るこ

とのできる方法に比較してどのような利点があるのか明らかにしてほしい。

目標 3 で、WET 試験で影響の認められる環境水中の内分泌かく乱物質の同定を行うことになっているが、原因物質の含まれていることが分かっている排水などをターゲットにしてはどうか。

6. 評点

評価ランク : A